

**Enzymbestimmung der
Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase
in fötalen menschlichen Organen**

Thomas Beier

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München

im Dr. von Haunerschen Kinderspital

Direktor: Prof. Dr. K. Betke

Enzymbestimmung der Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase
in fötalen menschlichen Organen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas B e i e r

aus

Wolfratshausen

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. J. Schaub
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Betke
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	28.11.1978



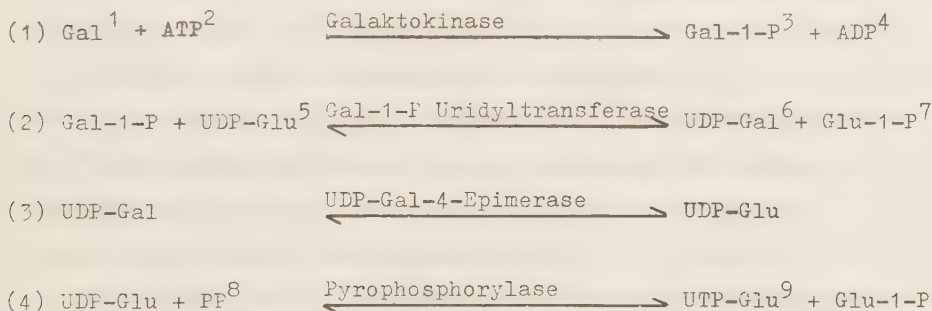
meinen Eltern

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Einleitung	S. 1
Material	S. 5
1. Chemische Reagenzien	S. 5
2. Menschliche Organe	S. 5
3. Haltbarkeit des Enzyms	S. 6
4. Abkürzungen	S. 7
Methoden	S. 8
1. Gewebeaufschluß	S. 8
2. Proteinbestimmung	S. 8
3. Enzymtest	S. 10
4. Produktidentifikation	S. 12
5. Präparation der DEAE-Cellulose	S. 14
6. Methodenkritik	S. 14
Ergebnisse	S. 16
1. Ermittlung optimaler Testbedingungen	S. 16
2. Enzymentwicklung	S. 17
3. Km-Kinetik	S. 19
Diskussion	S. 20
Zusammenfassung	S. 25
Tabellen und Abbildungen	S. 27
Literaturverzeichnis	S. 43

E I N L E I T U N G

Die Galaktosämie, eine autosomal rezessiv vererbare Stoffwechselkrankheit (11,41), ist gekennzeichnet durch das Fehlen der Aktivität der Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase (E.C.2.7.7.12.) (1,16). Dieses Enzym, das die Reaktion Galaktose-1-Phosphat + Uridindiphosphat = Uridindiphosphat-Galaktose + Glukose-1-Phosphat katalysiert, ist notwendig, um die im Darm mit der Nahrung aufgenommene Galaktose in Glukose umzuwandeln. Diese Umwandlung läßt sich durch folgende vier Reaktionen beschreiben (17,23,40):



Bei homozygot galaktosämischen Patienten sind die Enzymaktivitäten der Reaktionen 1, 3 und 4 normal (14).

Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase (Transferase) wurde in menschlichen Erythrozyten (13,16,20,30),

Leukozyten (13,26,42), Fibroblasten (22) und Leberzellen (1,36) gefunden. Das Fehlen der Enzymaktivität in diesen Geweben, und der dadurch bedingte Anstau des Galaktose-1-Phosphats, das nicht weiterverarbeitet wird (33), ist die biochemische Grundlage der Störung bei der Galaktosämie. Entscheidend für die Diagnose ist der Nachweis des Enzymdefekts in den Erythrozyten (2,5,32). Die pränatale Früherkennung ist durch die Bestimmung der Enzymaktivität in kultivierten Amnionzellen möglich (8,28). Bei heterozygoten Patienten können 50% der normalen Transferaseaktivität nachgewiesen werden (6,15,32).

Die Galaktosämie ist eine schwere Krankheit des Säuglings- und Kindesalters - Ikterus, Hepatosplenomegalie, Leberzirrhose, Katarakt, mentale Retardierung und Gedeihstörung - , die sich im Erwachsenenalter klinisch zu bessern scheint. Deshalb wurde nach verschiedenen Enzym- und Stoffwechseleigenschaften in den einzelnen Altersstufen gesucht. Die im Säuglingsalter erhöhte Galaktosezufuhr mit der Nahrung, deren Maximum unterhalb der ersten sechs Lebensmonate liegt, erfordert vom Organismus eine gesteigerte Galaktosestoffwechselaktivität. Die Adaption der Leber an die Galaktosemetabolisierung ist folglich zu diesem Zeitpunkt am größten. Die verlangsamte Elimination der Galaktose in den ersten zehn Lebenstagen bei reifgeborenen Säuglingen könnte auf eine Unreife der enzymatischen Leberleistung zurückzu-

führen sein (19). Die geringere Galaktosezufuhr im späteren Lebensalter bedeutet eine niedrigere Belastung und Anforderung an den Galaktosestoffwechsel. Der erhöhte Galaktosestoffwechsel des Säuglings hat eine gering gesteigerte Enzymaktivität der Gal-1-P Uridyltransferase, sowie eine zwei bis drei mal höhere Galaktikinase- und Epimeraseaktivität zur Folge (43). Im Hämolysat Neugeborener wurde eine gegenüber Erwachsenen 10% erhöhte Transferaseaktivität gefunden (44). Die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus radioaktiv markierter ^{14}C -Galaktose von intakten Erythrozyten war bei Neugeborenen drei mal höher als bei Erwachsenen (35). In der elektrophoretischen Mobilität scheinen zwischen fötalen Enzymen in Erythrozyten und kultivierten Fibroblasten und Enzymen Erwachsener keinerlei Unterschiede zu bestehen (10).

Bei Versuchen an Rattenlebergewebe wurde ein Ansteigen der Transferaseaktivität während der Gestation und einige Tage nach der Geburt beschrieben, dem dann ein rascher Abfall auf Erwachseneniveau folgte (3).

In Erythrozyten und Lebergewebe von Galaktosämiepatienten konnte kein altersspezifischer Unterschied in der Restaktivität der Transferase gefunden werden (7).

Da sich die Galaktosämie schon vor der Geburt durch vermindertes Gewicht der Säuglinge - durchschnittlich wiegen Galaktosämiekinder 0,3 kg weniger als gesunde (12) - und

erhöhte Galaktose-1-Phosphat Konzentration im Herzblut (34) manifestieren kann, ist es wichtig Charakteristika der Gal-1-P Uridyltransferase in fötalen Organen zu erfahren. In bezug auf die pränatale Diagnostik ist es interessant die unterschiedlichen Aktivitäten der Transferase in Geweben gesunder Föten zu kennen.

Die Intention dieser Arbeit ist, das fötale Enzym in Leber, Milz, Lunge, Herzmuskel, Niere, Skelettmuskel und Hirngewebe zu messen. Desweiteren ist es wichtig die Affinität der Transferase zum Substrat, d.h. zu Galaktose-1-Phosphat und Uridindiphosphat-Glukose zu ermitteln, um eventuelle Unterschiede der Enzymeigenschaften in den verschiedenen Altersstufen festzustellen, die die oft unterschiedlichen Manifestationen bzw. Varianten der Galaktosämie erklären könnten.

M A T E R I A L

1. Chemische Reagenzien

Galaktose-1-Phosphat, Uridindiphosphat-Glukose: Boehringer, Mannheim

^{14}C -Galaktose-1-Phosphat (384 mCi/mMol): Amersham Buchler, Braunschweig

Triton X-100, PPO (2,5-Diphenoloxazol), POPOP (1,4-bis-2-Phenyloxazolyl-Benzene), Toluol : Carl Roth, Karlsruhe

Cystin-HCl, Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Natriumwolframat 100,0 g, Natriummolybdat 25,0 g, o-Phosphorsäure 50,0 ml, Salzsäure rauchend min. 37% p.a. 100,0 ml, Lithiumsulfat 150,0 g), Seignettesalz, Glycin-NaOH, Rinderserumalbumin: Merck, Darmstadt

Cellulose: Serva Feinbiochemica

2-Merkaptoäthanol: Schuchart, München

2. Menschliche Organe

Die für die Enzymtests verwendeten gesunden Föten wurden von der I. und II. Frauenklinik der Universität München erhalten. Alle Aborte, die zwischen der 7. und 28. Schwangerschaftswoche durch Applikation von Prostaglandin ausgelöst wurden, waren legal und aus medizinischen oder sozialen

Gründen indiziert. Den Föten wurden innerhalb 30 Minuten nach der Interruptio die entsprechenden Organe entnommen, diese in Reagenzgläser oder Plastiktüten abgefüllt und bis zur Messung bei -20°C tiefgefroren. Leber, Milz und Niere wurden total entfernt, die Herzmuskulatur wurde im Ventrikelbereich, der Skelettmuskel am Oberschenkel und das Hirngewebe am Großhirn entnommen. Einem in der 28. Schwangerschaftswoche frühgeborenen Mädchen, das nach zwei Tagen auf der Neugeborenen-Intensiv-Station verstorben war, konnten nur Teile der Leber, Niere und des Skelettmuskels entfernt werden, da anschließend eine pathologische Untersuchung erfolgte. Einem wegen eines Hydrozephalus totgeborenen Knaben konnten bis auf Hirngewebe Proben aller anderen Organe entnommen werden. Lebergewebe von drei gesunden Kindern im Alter von 5 Monaten und 4,5 Jahren wurden durch Autopsie erhalten. Diese Leberproben wurden innerhalb der ersten 8 Stunden post mortem bei -20°C tiefgefroren. Das Lebergewebe eines vierjährigen homozygot galaktosämischen Knaben (C.K.) wurde mittels Stanzbiopsie gewonnen.

3. Haltbarkeit des Enzyms

Wenn die Gewebe nicht sofort eingefroren werden, sinkt die Aktivitätsausbeute der Transferase im Sinne einer

e-Funktion. Bei 37°C waren nach 10 Minuten noch 50% und nach 30 Minuten noch 25%, bei 4°C nach 10 Minuten 90% und nach 30 Minuten 80% der Ausgangsaktivität vorhanden (39).

4. Abkürzungen

- | | |
|--------------|----------------------------|
| 1) Gal : | Galaktose |
| 2) ATP : | Adenosintriphosphat |
| 3) Gal-1-P : | Galaktose-1-Phosphat |
| 4) ADP : | Adenosindiphosphat |
| 5) UDP-Glu : | Uridindiphosphat-Glukose |
| 6) UDP-Gal : | Uridindiphosphat-Galaktose |
| 7) Glu-1-P : | Glukose-1-Phosphat |
| 8) PP : | Pyrophosphat |
| 9) UTP : | Uridintriphosphat |

M E T H O D E N

1. Gewebeaufschluß

Bei Gebrauch wurden die Organe aufgetaut und außer dem Hirngewebe, das sehr dünnflüssig ist, in physiologischer Kochsalzlösung gespült. Nachdem die Gewebe mit Lüschnpapier getrocknet waren, wurden die Organproben in 5 oder bei sehr kleinen Mengen in 10 Teilen 10 mM 2-Merkaptoäthanol mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator zerkleinert, unter der Vorstellung, daß durch die SH-Gruppe des Merkaptoäthanol eine Stabilisierung des Enzyms erreicht wird. Die Homogenisate wurden anschließend bei 10 000 g 30 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde von der Fettemulsion durch Abpipettieren befreit und, in 1,7 ml Eppendorf-Gefäßen abgefüllt, bei -20°C tiefgefroren. Die Haltbarkeit der Transferase im tiefgefrorenen Homogenisat war um 10% besser als im Gewebe.

2. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Geweben wurde nach der Methode von Lowry (25) gemessen, die in unserem Labor modifiziert wurde. Die Homogenisate wurden aufgetaut und in einer Eppendorf-Zentrifuge bei Zimmertemperatur eine

Minute zentrifugiert. Anschließend wurden Leber- und Milzhomogenisate 1:50, Herz-, Lungen-, Muskel-, Nieren- und Hirnhomogenisate 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt. Zur Identifikation der Proteinwerte wurde ein Rinderserumalbuminstandard mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0,5 mg/ml. Für die Proteinmessung waren vier chemische Reagenzien erforderlich.

A: 2% Na_2CO_3 in 0,1n NaOH

Ba: 5,5 g CuSO_4 /100 ml H_2O

Bb: 1,35 g Seignettesalz/100 ml H_2O (NaK-Tartrat)

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz:

Aus diesen Lösungen wurden zwei Gemische hergestellt, die bei jeder neuen Proteinmessung frisch angesetzt werden mußten.

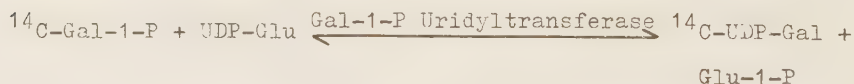
1:	0,2 ml Bb	2:	0,1 ml B
	0,02 ml Ba		5,0 ml A
	0,22 ml B		5,1 ml C

Anschließend wurden sowohl 20 μl des verdünnten Homogenisats, als auch der Rinderserumalbuminverdünnungsreihe mit 200 μl des frischen Kupferreagenz C vermischt und zehn Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurden 20 μl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, 1:2 mit 2% Na_2CO_3 verdünnt, hinzugegeben, gemischt und 30-35 Minuten in Dunkelheit bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Proben wurden dann in eine

Mikroküvette pipettiert und bei 772 nm in einem Eppendorff-photometer mit rotempfindlichem Multiplier gemessen. Die Proteinwerte lassen sich an der Standardkurve des Rinder-serumalbumins ablesen und bei Berücksichtigung des Leerwerts und der Verdünnung in mg/ml berechnen. Der Leerwert wurde durch einen gleichbehandelten Ansatz mit Wasser statt Homogenisat hergestellt. Bei allen Messungen wurden Doppelwerte bestimmt.

3. Enzymtest

Die Transferaseaktivität wurde nach der durch uns (37) modifizierten radioaktiven Methode von Bertoli und Segal (3) bestimmt. Der Test basiert auf der Bildung von ^{14}C -UDP-Galaktose während der Inkubation mit radioaktiv markiertem ^{14}C -Gal-1-Phosphat und UDP-Glukose gemäß der Reaktion:



Für die Ausführung des Versuchs waren folgende Substanzen notwendig:

- a) Gal-1-P 13,46 mM
- b) UDP-Glukose 20,2 mM
- c) Glycin-NaOH 1,0 M pH 8,2
- d) Cystin-HCl 0,2 M pH 8,2

- e) DEAE-Cellulose HCl-Form.
- f) Szintillationsflüssigkeit: 3 g PPO, 0,2 g POPCF,
350 g Triton X-100, 750 ml Toluol
- g) ^{14}C -Gal-1-Phosphat 10 $\mu\text{Ci/ml}$
- h) 2-Merkaptoethanol 10 ml

Für die Inkubation wurde ein Reaktionsgemisch angesetzt, das 10 μl UDP-Glukose (20,2 mM), 125 μl Glycin-NaOH (1,0 M, pH 8,2), 250 μl Cystin-HCl und 125 μl einer radioaktiven Lösung, zusammengestellt aus 1,0 ml ^{14}C -Gal-1-P (10 $\mu\text{Ci/ml}$) und 0,5 ml Gal-1-Phosphat (13,46 mM), enthielt. Dieses Gemisch mußte für jeden Versuch neu zubereitet werden, da Cystin-HCl bei pH 8,2 sehr instabil ist und deshalb bei pH 1,5 bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt werden muß. Die Titration auf pH 8,2 vor jedem Test erfolgte mit 1 N NaOH. Bei sechs Versuchen wurde zusätzlich eine Enzymmessung durchgeführt, indem Cystin-HCl durch 10 ml 2-Merkaptoethanol ersetzt wurde. 2-Merkaptoethanol hat den Vorteil, daß es bei Zimmertemperatur stabil ist und deshalb das Reaktionsgemisch nicht vor jedem Versuch neu zusammengestellt werden muß. Das Reaktionsgemisch enthielt in 100 μl Lösung 1,1 mmol ^{14}C -Gal-1-P (0,1 μCi), 0,4 mmol UDP-Glukose, 250 mmol Glycin-NaOH und 97,5 mmol Cystin-H bzw. 4,9 mmol 2-Merkaptoethanol. Durch Vermischung von 100 μl Reaktionslösung mit 50 μl verdünntem Gewebehomogenisat, das im Falle der Leber 5-15 μg Protein und bei den

übrigen Organen 10-30 μ g Protein enthielt, wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubation wurde bei 37°C durchgeführt und nach 60 Minuten durch 2-minütiges Denaturieren der Lösung bei 95°C gestoppt. Das Inkubationsgemisch wurde dann im Eisbad gekühlt, 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand einer Säulenchromatographie zugeführt, um die Produkte der Reaktion von den Substraten zu trennen. Mit den einzelnen Verdünnungen der Gewebeproben wurde jeweils eine Doppelwertbestimmung durchgeführt. Für die Leerwertbestimmung wurde eine gleichbehandelte Probe vor der Inkubation bei 95°C zwei Minuten denaturiert und dann wie die anderen Proben behandelt.

4. Produktidentifikation

Eine 2ml Plastikspritze, deren Stempel entfernt und Spritzenöffnung mit Glaswolle abgedeckt war, wurde mit DEAE-Cellulose (HCl-Form) bis zur 0,8 ml-Linie gefüllt. 100 μ l des Überstandes des denaturierten Inkubationsgemisches wurden in die Spritze pipettiert. Nachdem das Gemisch in die Cellulose eingezogen war, wurden drei 2ml-Fraktionen mit je 20 mM HCl und zwei 2ml-Fraktionen mit je 100 mM HCl eluiert. Jede der fünf Fraktionen wurde direkt in je einem Szintillationsgefäß aufgefangen. Um die Radioaktivität messen zu können,

mußten zu den 2 ml in den Szintillationsgefäßen 10 ml Szintillationsflüssigkeit (3 g PPO, 0,2 g POPOP, 350 g Triton X-100, 750 ml Toluol) gegeben werden. Dabei mußte das jetzt in den Gefäßen befindliche Gemisch klar sein, da andernfalls die Aktivitätsausbeute sich stark verringerte und eine korrekte Messung nicht möglich war. Eine eventuelle Trübung des Gemisches konnte durch weitere Zugabe von Szintillationsflüssigkeit behoben werden. Die Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitszintillationszähler der Firma Packard (USA) bestimmt.

In den ersten drei Fraktionen wurde ^{14}C -Gal-1-P, das als Molekül mit einem Monophosphat von der 20 mM HCl eluiert wurde, gezählt. In den letzten zwei Fraktionen waren Moleküle mit einer Diphosphatgruppe, die von der 100 mM HCl ausgeschwemmt wurden. Diese enthielten ^{14}C -UDP-Gal, das während der Inkubation entstanden ist, und sehr wenig ^{14}C -UDP-Glu, das durch die Epimerase aus ^{14}C -UDP-Gal gebildet wurde, aber bei der Berechnung der spezifischen Aktivität der Transferase vernachlässigt werden kann. Die Enzymaktivität der Gal-1-P Uridyltransferase wurde durch das Verhältnis von ^{14}C -UDP-Gal zu der Radioaktivität in allen fünf Fraktionen von ^{14}C -Gal-1-P und ^{14}C -UDP-Gal erhalten. Die Einheit der Enzymaktivität ist U (Unit) und wird in nmoles produziertes ^{14}C -UDP-Gal/min/ μg Protein angegeben.

5. Präparation der DEAE-Cellulose (HCl-Form)

10 g trockenes Cellulosepulver wurde in 4 l destilliertem Wasser aufgelöst. Nachdem sich die Cellulose gesetzt hatte, wurde der Überstand dekantiert. Danach wurde das Sediment drei mal mit destilliertem Wasser gewaschen, 1 N NaOH zugegeben und eine Stunde gerührt. Anschließend wurde das Sediment mit destilliertem Wasser gewaschen bis pH 7,0 erreicht war. Dann wurde 0,1 N NaOH zugegeben und eine Stunde gerührt. Das Sediment wurde nochmals mit destilliertem Wasser gewaschen bis Neutralität erreicht war. In dieser Form wurde die Cellulose im Kühlschrank aufbewahrt. Vor dem Test wurde die Cellulose aufgewärmt und mit 20 mM HCl gewaschen.

6. Methodenkritik

Im Gegensatz zum UDP-Glukose Verbrauchstest (5) mißt die hier beschriebene Methode das Produkt der Reaktion $^{14}\text{C-Gal-1-P} + \text{UDP-Glu} = ^{14}\text{C-UDP-Gal} + \text{Glu-1-P}$, nämlich $^{14}\text{C-UDP-Gal}$, und nicht den Verbrauch des Substrates, d.h. UDP-Glu. Im Inkubationsgemisch wird durch die Epimerase aus $^{14}\text{C-UDP-Gal}$ $^{14}\text{C-UDP-Glu}$ gebildet. Diese beiden Moleküle mit je einer Diphosphatgruppe werden bei der Säulenchromatographie mit 100 mM HCl mit den letzten zwei Fraktionen eluiert und deren Aktivität im Flüssigkeitszintillationszähler gemessen.

Da aber ^{14}C -UDP-Glu aus ^{14}C -UDP-Gal gebildet wird, hat dieser Sachverhalt keine Auswirkungen auf die Genauigkeit der Ergebnisse. Beim UDP-Glu Verbrauchstest wird durch die Epimerase UDP-Gal aus UDP-Glu gebildet. Dadurch verkleinert sich die UDP-Glu Konzentration, die alleine ausschlaggebend für die Messung der Aktivität der Transferase ist. Aus diesem Grund werden beim UDP-Glu Verbrauchstest niedrigere Ergebnisse erzielt. Bei diesem Test benötigt man zur Messung UDP-Glu Dehydrogenase, deren Aktivität und Reinheit aber sehr großen Schwankungen unterliegt, was sich auf die Ergebnissenauigkeit negativ auswirkt (27). Da die Aktivität der Epimerase bei Neugeborenen zwei bis drei mal höher als bei Erwachsenen ist (43), sollte die Radioaktivitätsmethode dem UDP-Glu Verbrauchstest vorgezogen werden, ebenso bei sehr niedriger Transferaseaktivität. Die Aktivität der Epimerase ist abhängig von exogen zugeführtem NAD, da NAD durch NADase zerstört wird (20).

Die Säulenchromatographie mit DEAE-Cellulose ergibt durchschnittlich genauere Werte als mit DEAE-Cellulosepapier (37) und erfordert keinen wesentlich größeren Zeitaufwand. Diese Methode ergibt gute Duplikate und niedrige Blindwerte.

ERGEBNISSE

1. Ermittlung optimaler Testbedingungen

Um eine optimal vergleichbare Aktivitätsausbeute der Transferase bei einer bestimmten Proteinkonzentration zu erzielen, wurde die Enzymaktivität bei Proteinnengen zwischen 0,09 mg/ml und 9,4 mg/ml gemessen. Dabei zeigte sich eine Linearität von 0,09 mg/ml bis 0,4 mg/ml (Abb.1). Die Proteinkonzentrationen in den Versuchen wurden nach diesen Werten ausgerichtet. Leberhomogenisat enthielt in 50 μ l Testansatz zwischen 5 und 15 μ g Protein, die restlichen Organe zwischen 10 und 30 μ g. Bei anderen Proteinkonzentrationen wurde nicht gemessen.

Die Zeitdauer der Bildung von ^{14}C -UDP-Galaktose aus ^{14}C -Gal-1-P wurde nach 1, 5, 10, 30 und 60 Minuten bestimmt (Abb.1). Dabei fand sich eine deutliche Linearität zwischen Zeit und Transferaseaktivität während der gesamten 60 Minuten.

Zur Feststellung des pH-Optimums des Reaktionsgemisches wurde die Enzymaktivität in der Leber bei pH 7.4, 7.6, 8.0, 8.2, 8.4, 8.7 und 9.0 gemessen (Abb.2). Die maximale Aktivitätsausbeute in fötalem Lebergewebe wurde bei pH 8.2 erzielt. Die restlichen Gewebe wurden nicht auf die pH-Abhängigkeit der Transferaseaktivität untersucht. Bei pH 8.2 wurden die Reaktionsgemische der Leber-, wie der anderen Organproben

result.

Wiederholungsmessungen ergaben, daß die Enzymaktivität bei -10°C tiefgefrorenen Organen nach zwei Monaten nicht abgenommen hatte. Nach mehrmaligen Auftauen und Einfrieren der Gewebe und der Homogenisate wurde jedoch ein Aktivitätsverlust bis zu 50% gefunden.

2. Enzymentwicklung

Aus den Abbildungen 3-9 und den Tabellen 1 und 2 ist die altersbedingte Entwicklung der spezifischen Aktivität der Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase in Leber-, Milz-, Lungen-, Herz-, Nieren-, Muskel- und Hirngewebe zu ersehen. Die Transferaseaktivität in Leber, Milz, Herz und Lunge stieg mit zunehmender Gestationszeit in dem beobachteten Zeitraum stark an. Die Enzymaktivitäten betrugen in der Leber 7,9 - 53,0 U (Unit: $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein), in der Milz 0,5 - 6,7 U, in der Lunge 0,7 - 6,0 U und im Herzmuskel 0,7 - 6,0 U (Tab.1). Je höher die Transferaseaktivität in der Leber war, desto höher wurde sie bei den einzelnen Föten in Milz, Lunge und Herz gemessen. Außerdem war in diesen Geweben ein deutlicher Unterschied der Enzymaktivität zwischen männlichen und weiblichen Föten festzustellen (Tab.2). In Niere, Skelettmuskulatur und Hirngewebe war keine altersabhängige Änderung der Transferaseaktivität zu beobachten. Sie reichte in der Niere

von 1,8 - 4,7 U, im Skelettmuskel von 0,6 - 4,0 U und im Hirn von 0,6 - 1,5 U (Tab.1,2). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied konnte bei diesen drei Organen ebenfalls nicht festgestellt werden. Von allen sieben Gewebearten war unabhängig von Alter und Geschlecht die Aktivität im Hirn immer am niedrigsten, in der Leber immer am höchsten.

Für die Transferaseaktivität des nach der 40. Schwangerschaftswoche totgeborenen Kindes ergaben sich in der Lunge (2,1 U) und im Herzmuskel (1,8 U) sehr niedrige Werte; Leber- (20,0 U) und Milzenzym (4,5 U) stimmten mit den Durchschnittswerten der Aktivität der Föten im Alter zwischen 23 und 28 Schwangerschaftswochen überein (Tab.1).

Die Transferaseaktivität in der Leber des fünf Monate alten Kindes betrug 14,5 U, die der beiden Kinder im Alter von 4,5 Jahren war 12,5 U und 18,4 U. Im Lebergewebe eines vierjährigen homozygoten Galaktosämiepatienten fand sich eine Restaktivität von 0,35 U (Tab.3).

Bei sechs Versuchen wurde Cystin-HCl (0,2 M) durch 2-Merkaptoethanol (10 mM) ersetzt. Doch ergaben sich bei diesen Tests stark erniedrigte Aktivitätsausbeuten. In der Leber wurden 25%, in der Milz 45%, in der Lunge 28%, im Herz 42%, in der Niere 48%, im Skelettmuskel 50% und im Hirngewebe 65% der Aktivität im Vergleich zu den mit Cystin-HCl durchgeführten Versuchen gemessen.

3. Km-Kinetik

Die Michaelis Konstante K_m ist gleich der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist; je niedriger K_m desto höher ist die Affinität des Enzyms zum Substrat. Das Lineweaver-Burk Diagramm stellt die Beziehung zwischen Enzymaktivität (Gal-1-P Uridyltransferase) und Substrat (Gal-1-P , UDP-Glu) graphisch dar. K_m der Transferase im Lebergewebe für Gal-1-P wurde bei Gal-1-P Konzentrationen von 5,0, 2,5, 1,25, 0,6, 0,3, 0,15, 0,07, 0,04 und 0,02 mM gemessen. Die UDP-Glu Konzentration lag dabei konstant bei 0,264 mM. Die K_m -Werte für Gal-1-P der fötalen Transferase betrugen zwischen 0,320 und 0,357 mM, K_m in der Neugeborenenleber war 0,330 mM, im Lebergewebe des Kindes von 4,5 Jahren 0,340 mM (Tab.4). Eine Substrathemmung war ab 2,0 mM zu verzeichnen (Abb.10a,10b).

In der Transferase im Lebergewebe für UDP-Glukose wurde bei UDP-Glu Konzentrationen von 1,1, 0,54, 0,264, 0,133, 0,067, 0,033, 0,017 und 0,0085 mM bestimmt. Die Gal-1-P Konzentration war dabei konstant 0,733 mM. Die K_m -Werte der Transferase für UDP-Glu wurden mit 0,167 mM in der Neugeborenenleber und mit 0,140 mM im Lebergewebe eines 11 Wochen alten Föten gemessen (Tab.5). Eine Substrathemmung war ab 0,35 mM UDP-Glu zu beobachten (Abb.11).

DISKUSSION

Viele Erkenntnisse, die für das Verstehen der Galaktosämie von Bedeutung sind, wurden an Blutzellen gewonnen, in denen das Fehlen der Gal-1-P Uridyltransferase auch zuerst entdeckt wurde (16). Deshalb sollen die hier erzielten Ergebnisse mit den an Blutzellen, besonders den an Erythrozyten, gefundenen in Bezug gesetzt werden. Aber auch Werte von fötalen Rattenorganen sollen zum Vergleich herangezogen werden. Von den sieben untersuchten Organen verdient die Leber durch ihre Schlüsselrolle im Galaktosestoffwechsel spezielle Beachtung.

Die spezifische Aktivität der Transferase stieg in Leber, Milz, Lunge und Herzmuskel während der Gestation von der 7. - 28. Schwangerschaftswoche stark an. Das Lebergewebe zeigte von allen Organen zu jedem Alter immer die höchste Enzymaktivität. Die Transferaseaktivität stieg von 7,9 U in der 7. Schwangerschaftswoche auf durchschnittlich 17,4 U in der 23. - 28. Schwangerschaftswoche an. In Leber, Milz, Lunge und Herzmuskel wurde außerdem ein deutlicher geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt, wobei die Enzymaktivität in männlichen Föten höher war als in den entsprechenden weiblichen. In fötalem Nieren-, Skelettmuskel- und Hirngewebe war weder ein geschlechtsspezifischer Unterschied noch ein Ansteigen der Transferaseaktivität

während der Gestation zu beobachten. Allerdings konnten diese Befunde wegen der geringen Fallzahl statistisch nicht gesichert werden.

Da keine Gewebeproben von Föten, die älter als 28 Wochen waren, vorlagen und nur die Enzymaktivitäten in den Organen eines totgeborenen Kindes bestimmt wurden, können nur vage Aussagen über die weitere fötale Entwicklung getroffen werden. Die Transferaseaktivität im Lebergewebe der Kinder im Alter von 5 Monaten und 4,5 Jahren war im Durchschnitt etwa 25% niedriger als die des Neugeborenen und der Föten der 23. - 28. Schwangerschaftswoche. Die Enzymaktivität scheint einige Monate nach der Geburt abzunehmen. Als Ergänzung und Vergleich sollen an Blutzellen gefundene Ergebnisse dienen. Im Hämolysat Neugeborener wurde während der ersten 48 Lebensstunden kein Ansteigen der Transferaseaktivität festgestellt. Diese Werte wurden mit dem UDP-Glu Verbrauchstest ermittelt, der durch die Epimerasewirkung niedrigere Ergebnisse als der hier angewandte Radioaktivitätstest ergibt (15). Das Neugeborenenhämolysat zeigt allerdings eine ca. 10% höhere Aktivität als das Erwachsener (44). Da die Enzymaktivität nach einem Jahr auf Erwachsenenenniveau absinkt, ist anzunehmen, daß die Enzymwerte in den untersuchten Kinderlebern adulten gleichzusetzen sind. Die Entwicklung der Transferase könnte sich

durch einen Anstieg der Aktivität während der Gestation, der sich nach der Geburt einige Wochen oder Monate fortsetzt, beschreiben lassen. Nach diesem Anstieg folgt ein Absinken auf Erwachseneniveau.

Diese ontogenetischen Änderungen und Unterschiede in fötalen menschlichen Organen sind mit den in fötalen Rattenorganen gefundenen Werten zu vergleichen. Die Transferaseaktivität steigt in der Rattenleber in den letzten 3 Tagen der Schwangerschaft und 5 - 10 Tage nach der Geburt stark an und nimmt anschließend merklich ab. Die Schwangerschaft dauert bei der Ratte 21 Tage. Ebenso war die Enzymaktivität in der fötalen Rattenleber zu jedem Alter am höchsten, die des Hirngewebes am niedrigsten. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied wurde in der Leber, ebenso wie beim Menschen nicht aber in der Niere gefunden (3). In der Leber erwachsener Ratten war die Transferaseaktivität $\frac{1}{3}$ der Neugeborenen, im Dünndarm nur $\frac{1}{5}$ (3,21).

Die Werte der Michaelis Konstante K_m der Transferase für Gal-1-P bzw. UDP-Glu als Substrat im Lebergewebe von Föten, Neugeborenen und Kindern sind mit in Rattenleber (3), Rattendünndarm (21) und menschlichen Erythrozyten (4) gefundenen Ergebnissen zu vergleichen. Die K_m -Werte der Transferase für UDP-Glu waren im Lebergewebe des Neugeborenen und des 11 Wochen alten Föten etwa gleich. Für die Aktivität der Transferase spielen auch die Faktoren eine Rolle, welche den

UDP-Glu Spiegel regulieren, wie z.B. die Aktivität der UDP-Glu Pyrophosphorylase und die Nutzung der UDP-Glukose in der Glykogen- und Glukuronsäuresynthese. Für Gal-1-P waren die Km-Werte der Transferase bei Föten-, Neugeborenen- und Kinderleber ebenfalls gleich. Die Ähnlichkeit der Km-Werte in den einzelnen Altersstufen während der Gestation stimmt mit den in Rattenlebergewebe gefundenen Ergebnissen überein (3). Die Enzymeigenschaften bezogen auf Km scheinen sich auf den jeweiligen Entwicklungsstufen nicht voneinander zu unterscheiden.

Um die Wirkung der Gal-1-P Konzentration auf die Stoffwechsellage des Organismus beurteilen zu können, muß auch der Einfluß der Galaktokinase berücksichtigt werden, da dieses Enzym durch Phosphorylierung der Galaktose der Transferase das Substrat zur Reaktion liefert. Die Aktivität der Galaktokinase nimmt postnatal stark ab und erreicht nach einem Jahr 20% der Ausgangsaktivität. Die durch die erniedrigte Galaktokinaseaktivität und die geringere Galaktosezufuhr mit der Nahrung bedingte Abnahme des Gal-1-P Angebots im Alter hat eine kleinere Galaktosestoffwechselbelastung des erwachsenen Organismus zur Folge. Dieser Tatbestand könnte eine Erklärung für die Besserung der Galaktosämiesymptome im Alter sein. Als weiterer Grund für die Besserung wurde die Anwesenheit residueller Transferase in der Leber (36) und der Dünndarmschleimhaut (31) beschrieben. Außerdem

scheint die Leber ein natürliches Regulationszentrum zu sein, das die Akkumulation von Gal-1-P, dem toxischen Agens der Galaktosämie, verhindert (3,33). Gal-1-P ist ein Inhibitor wichtiger Enzyme wie der Glukose-6-Phosphatase (18), der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (24), der Phosphoglukomutase (9,38) und der UDP-Glukose Phosphorylase (29).

Die Restenzymaktivität in der galaktosämischen Leber betrug 0,35 U, also etwa 2% der normalen. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen, als im Lebergewebe 1-2%, in Erythrozyten 1% und in Leukozyten 2% der normalen Aktivität gefunden wurden (13,31). Die K_m -Werte der Resttransferase im galaktosämischen Lebergewebe konnte nicht bestimmt werden, da durch das mehrmalige Auftauen und Einfrieren des Homogenisats das Protein zerstört war und keine Restaktivität mehr vorhanden war. In Erythrozyten gesunder, heterozygot und homozygot galaktosämischer Individuen wurde ein minimaler Unterschied in den K_m -Werten gefunden (4). Die Resttransferase in Erythrozyten Galaktosämiekranker scheint sich in diesen enzymkinetischen Eigenschaften nicht von der Transferase gesunder zu unterscheiden. Das schließt jedoch nicht aus, daß eine anormale Struktur vorliegt.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Aktivität der Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase in Leber, Milz, Lunge, Herzmuskel, Niere, Skelettmuskel und Hirn von 26 gesunden menschlichen Föten im Alter zwischen 7 und 28 Wochen und eines nach der 40. Schwangerschaftswoche totgeborenen Knaben, sowie im Lebergewebe von drei Kindern im Alter von 5 Monaten und 4,5 Jahren wurde gemessen. Außerdem wurde die Restenzymaktivität in der Leber eines vierjährigen galaktosämiekranken Kindes (C.K.) bestimmt. Der Inkubationstest wurde nach der von uns modifizierten ^{14}C -Methode von Bertoli und Segal (3,37) durchgeführt, indem radioaktives Substrat und zur Produktidentifikation eine Säulenchromatographie angewendet wurde. Diese Methode bewies eine sehr gute Empfindlichkeit und ergab zuverlässige Ergebnisse. Mit 2-Merkaptoethanol anstatt Cystin-HCl im Reaktionsgemisch wurde eine wesentlich geringere Aktivitätsausbeute erzielt.

Die Transferaseaktivität stieg während der Gestation in Leber, Milz, Lunge und Herzmuskulatur an. Die Enzymaktivität in diesen Organen war bei männlichen Föten höher als bei weiblichen. Zu jedem Alter zeigte Lebergewebe die höchste Transferaseaktivität, Hirngewebe die niedrigste. In Niere, Skelettmuskel und Hirn war weder ein altersabhängiger Anstieg der Transferase noch ein geschlechtsspezifischer

Unterschied zu verzeichnen. Die Enzymaktivität im kindlichen Lebergewebe war durchschnittlich 25% niedriger als in fötaler Leber der 23. - 28. Schwangerschaftswoche und im Lebergewebe des Totgeborenen. Die Resttransferaseaktivität in dem galaktosämischen Lebergewebe betrug 2,6 der normalen. Die in etwa gleichen Km-Werte der Transferase in allen gemessenen Leberproben erbringen keinerlei enzymkinetische Unterschiede in den einzelnen Alterstufen.

SSW ¹	LEBER	MILZ	LUNGE	HERZ	NIERE	MUSKEL	HIRN
7	7,9	0,8	0,3	0,1	---	---	1,15
11-14	² 14,0	1,35	2,55	2,4	3,3	1,9	1,1
	³ 8,2-18,4	1,2-1,75	0,7-3,6	0,7-3,6	2,5-4,5	1,3-2,7	0,9-1,5
	⁴ 6m/2w	2m/1w	5m/1w	5m/1w	4m	4m/1w	5m/1w
15-22	16,5	2,3	3,6	3,1	3,5	2,2	1,0
	10,0-33,0	0,5-2,6	1,0-6,7	0,6-6,0	2,0-4,0	0,6-4,0	0,6-1,5
	6m/4w	3m/2w	3m/2w	3m/3w	3m/3w	2m/3w	3m/3w
23-28	17,4	4,55	4,3	4,6	4,2	2,5	1,2
	14,3-30,0	3,2-6,7	2,7-6,0	2,8-6,0	1,8-4,7	1,8-2,6	1,1-1,4
	5m/2w	3m/1w	3m/1w	3m/1w	3m/2w	3m/2w	2m/1w
40	20,0	4,5	2,1	1,8	3,0	1,5	---
	1m	1m	1m	1m	1m	1m	

1): Schwangerschaftswoche

2): Medianwert (U)

3): Schwankungsbreite (U)

4): Anzahl der fötalen Organe
m=männlich/w=weiblich

Tabelle 1 : Spezifische Aktivität der Gal-1-P Uridyltransferase
in fötalen Organen - Abhängigkeit von der Gestations-
zeit

SSW ¹	LEBER	MILZ	LUNGE	HERZ	NIERE	MUSKEL	HINDEL
11-14	² 14,0	1,25	2,65	2,85	3,3	1,75	1,1
m	³ 6m	2m	5m	5m	4m	4m	5m
11-14	13,3	1,75	0,7	0,7	---	2,7	1,0
w	2w	1w	1w	1w	---	1w	1w
15-22	17,45	2,65	4,05	4,2	3,3	2,25	1,1
m	6m	3m	3m	3m	3m	2m	3m
15-22	12,5	1,1	1,5	2,4	3,6	2,9	0,8
w	4w	2w	2w	3w	3w	3w	3w
23-28	25,0	3,6	5,25	5,2	4,6	2,2	1,2
m	5m	3m	3m	3m	3m	3m	2m
23-28	15,5	5,4	2,7	4,85	2,9	2,6	1,1
w	2w	1w	1w	1w	2w	2w	1w

1): Schwangerschaftswoche 2): Medianwert (U)

3): Anzahl der fötalen Organe m=männlich / w=weiblich

Tabelle 2: Spezifische Aktivität der Gal-1-P Uridyltransferase
fötalen Organen - geschlechtsspezifischer Unterschied
in den einzelnen Altersstufen

Alter	Sex	Transferaseaktivität U (nol/g./in/ g)
5 Monate	weibl.	14,5 U
1,5 Jahre	weibl.	12,0 U
4,5 Jahre	weibl.	18,4 U
4 Jahre ⁺	männl.	0,35 U

⁺ homozygot galaktosämisch

Tabelle 3: Transferaseaktivität im Lebergewebe von Kindern

Probe, Nr.	Alter ⁺	Aktivität (U)	Km (UDP-Glu)
Fötus 1	7 Wochen	7,0 U	0,300 mM
Fötus 2	11 Wochen	14,0 U	0,140 mM
Fötus 3	20 Wochen	19,0 U	0,157 mM
Fötus 4	40 Wochen	20,0 U	0,167 mM
Kind 5	4,5 Jahre	18,4 U	0,160 mM

⁺Für Föten: Gestationszeit

UDP-Glukose Konzentration: 0,264 mM (UDP-Glu)

Tabelle 4: Km-Werte der Gal-1-P Uridyltransferase in der
Leber für Gal-1-P

Probe, Nr.	Alter ⁺	Aktivität (U)	Km (UDP-Glu)
Fötus 2	11 Wochen	14,0 U	0,140 mM
Fötus 4	40 Wochen	20,0 U	0,167 mM

⁺: Gestationszeit

Gal-1-P Konzentration: 0,733 mM (Gal-1-P)

Tabelle 5: Km-Werte der Gal-1-P Uridyltransferase in der
Leber für UDP-Glukose

%UDP-Gal
aus Gal-1-P

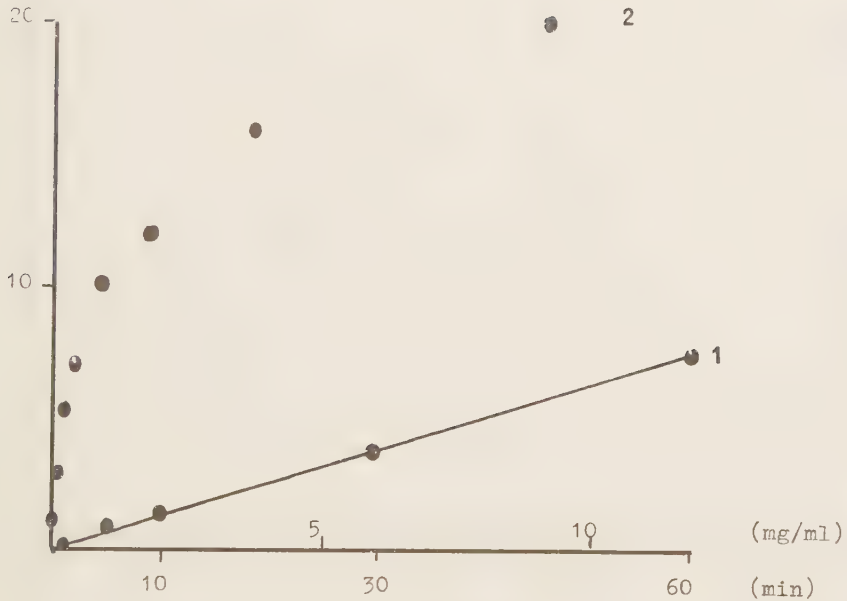


Abbildung 1: Einfluß der Zeit (1) und der
Proteinkonzentration (2) auf die
Transferaseaktivität in fötaler Leber

%UDF-Gal
aus Gal-1-P

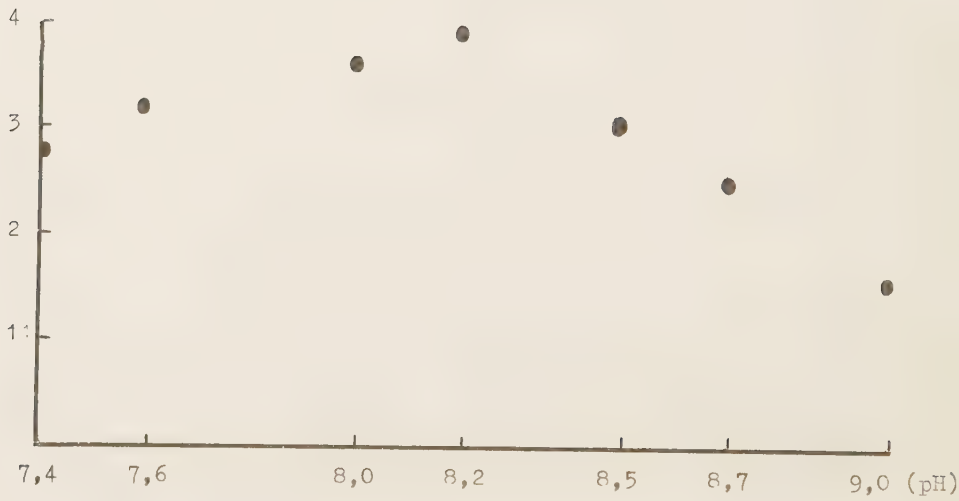


Abbildung 2: pH-Abhängigkeit der Transferaseaktivität in
fötaler Leber

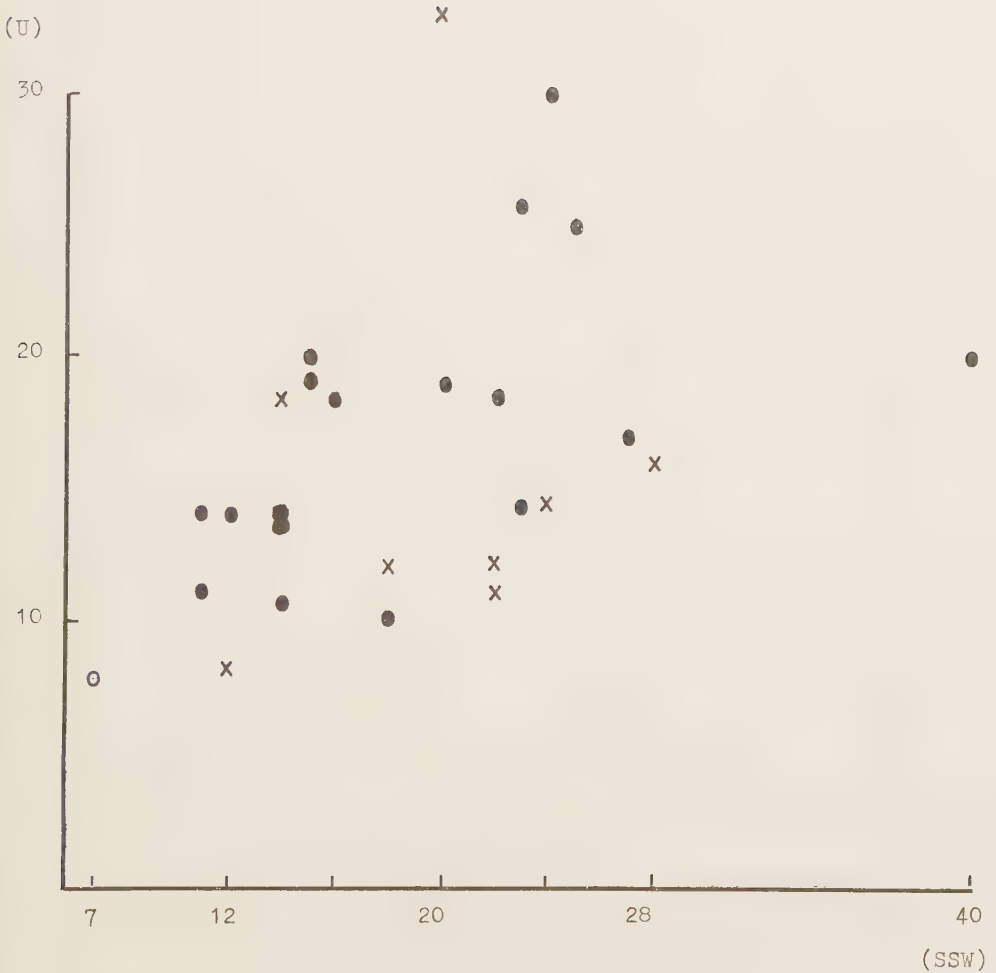


Abbildung 3: Transferaseaktivität in der Leber
während der Gestation

O: Geschlecht unbekannt, ●: männlich,
X: weiblich

(U)

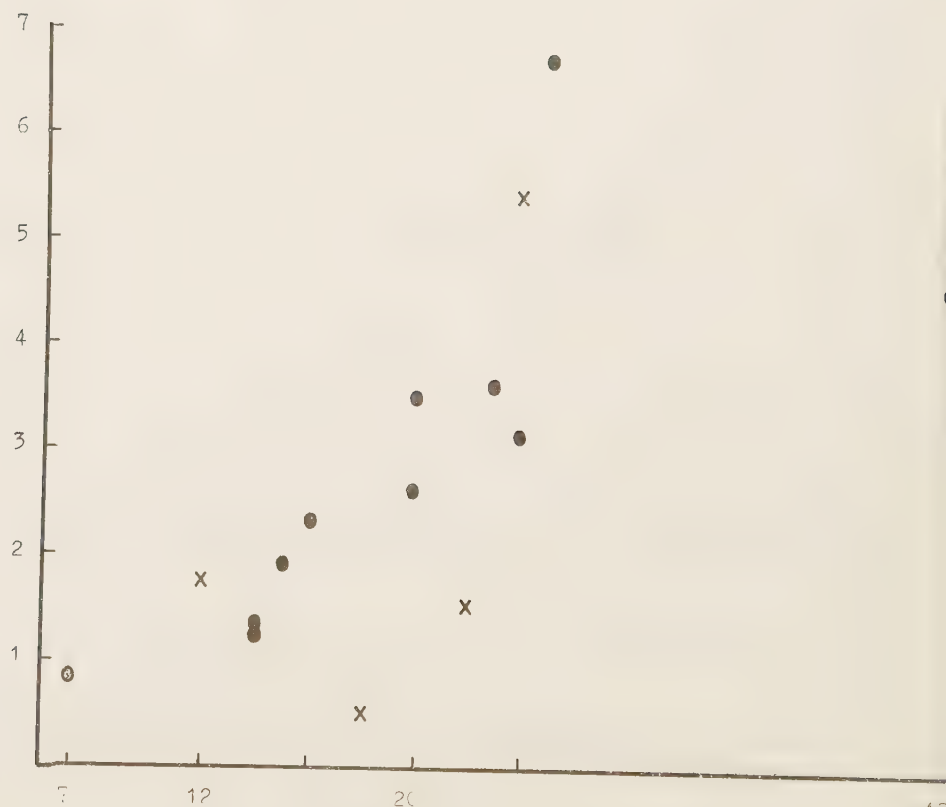
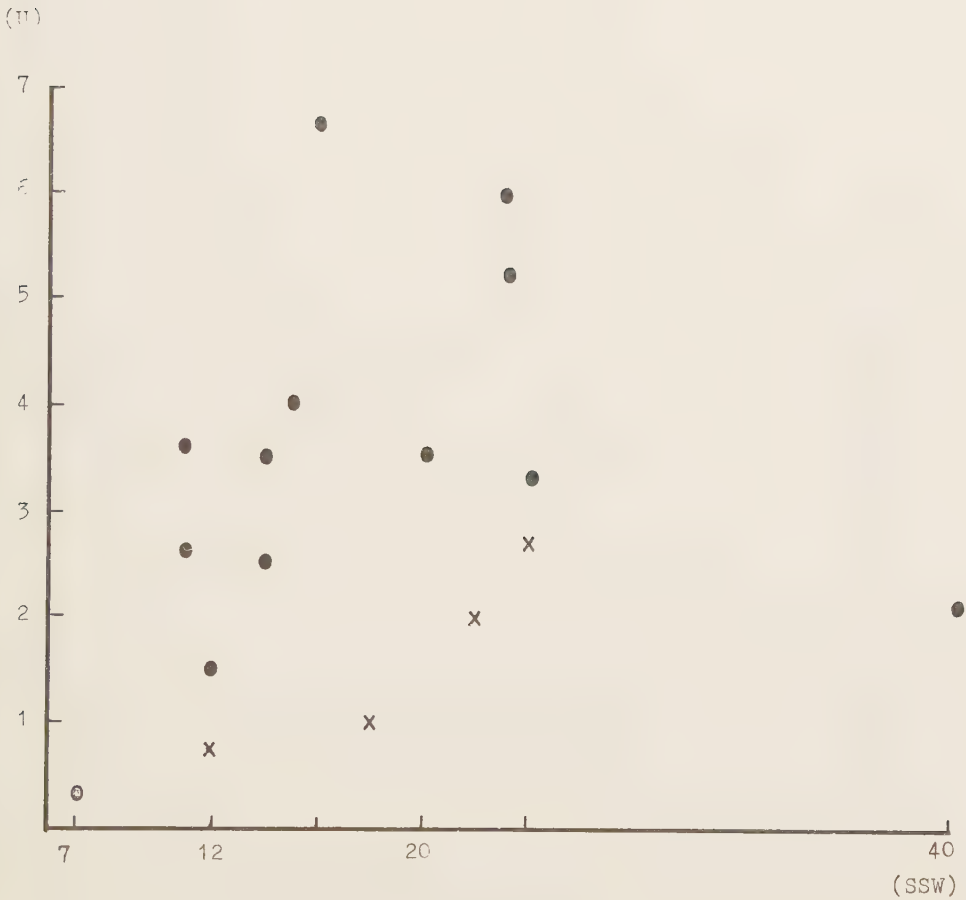


Abbildung 4: Transferaseaktivität in der Milz
während der Gestation

O: Geschl. unbek., ●: männl., X: weibl.



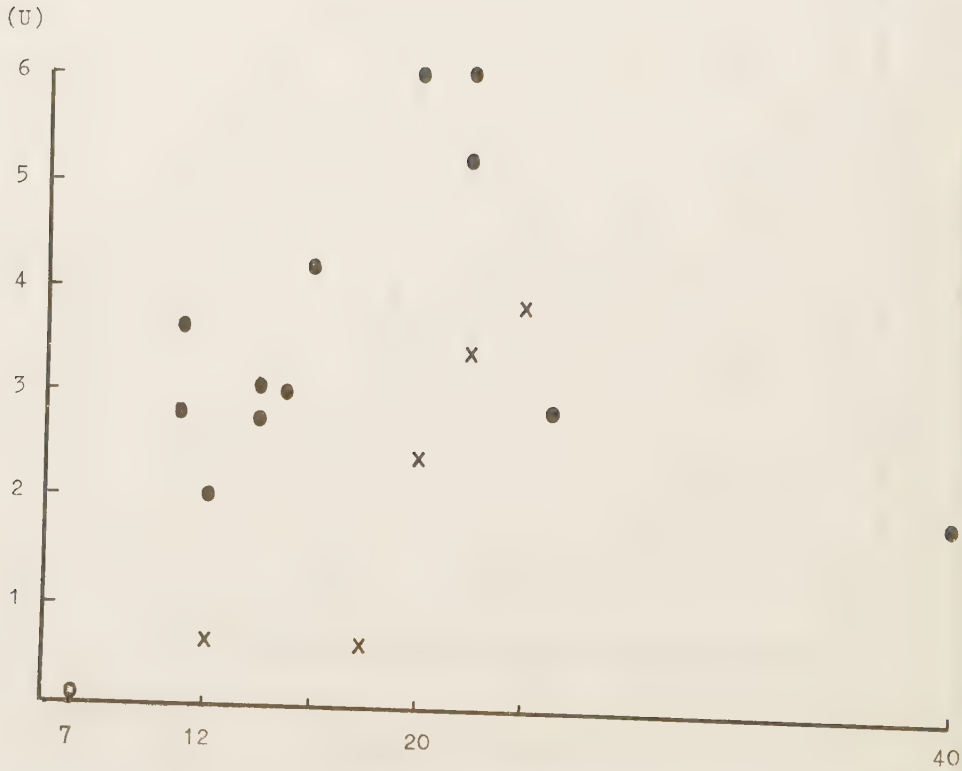


Abbildung 6: Transferaseaktivität im Herzmuskel
während der Gestation

O: Geschl. unbek., ●: männl., X: weibl.

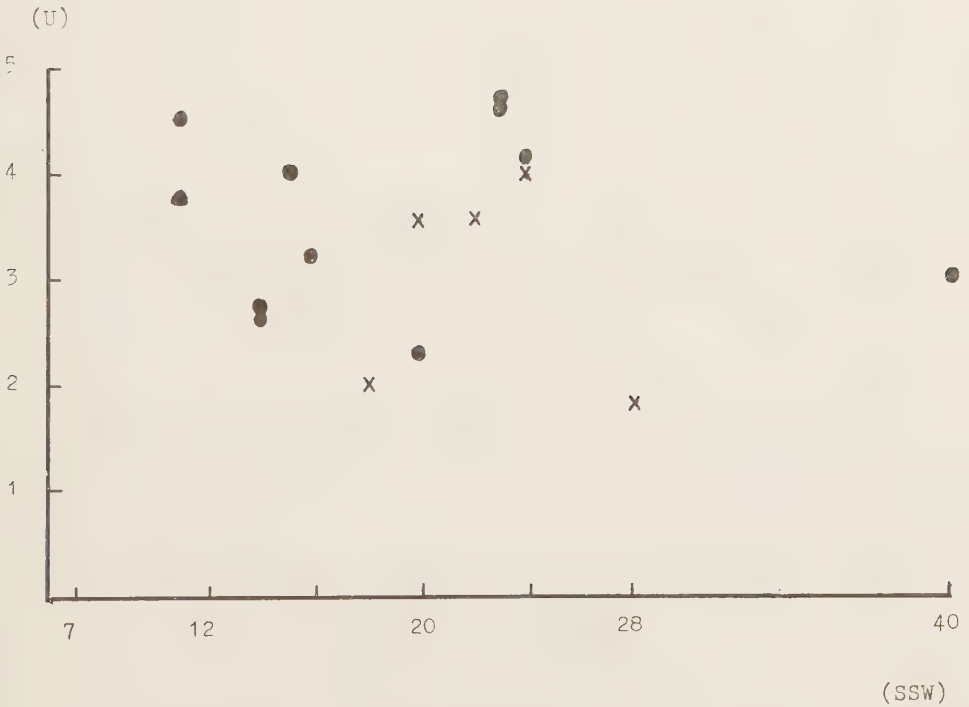


Abbildung 7: Transferaseaktivität in der Niere
während der Gestation
●: männl., x: weibl.

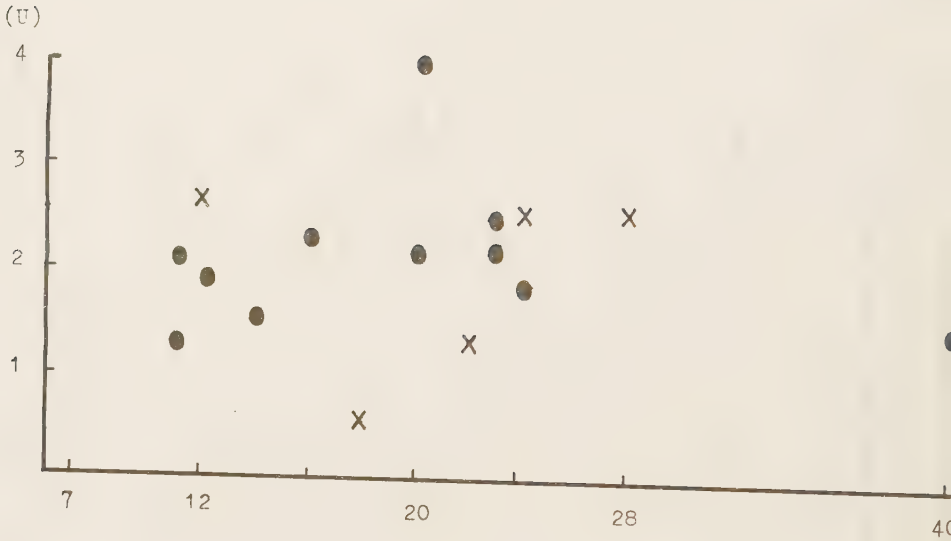


Abbildung 8: Transferaseaktivität im Skelettmuskel

während der Gestation

●: männl., X: weibl.

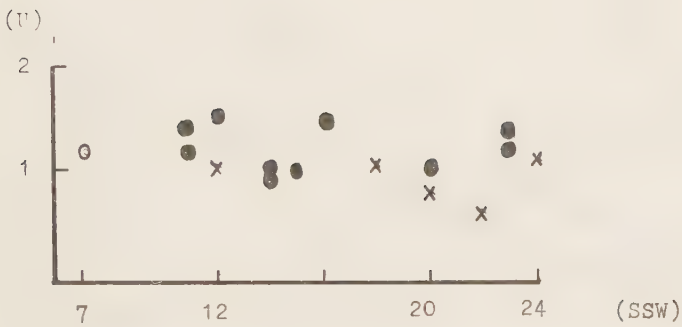


Abbildung 9: Transferaseaktivität im Hirngewebe
während der Gestation

● : männl., × : weibl.

○ : Geschlecht unbekannt

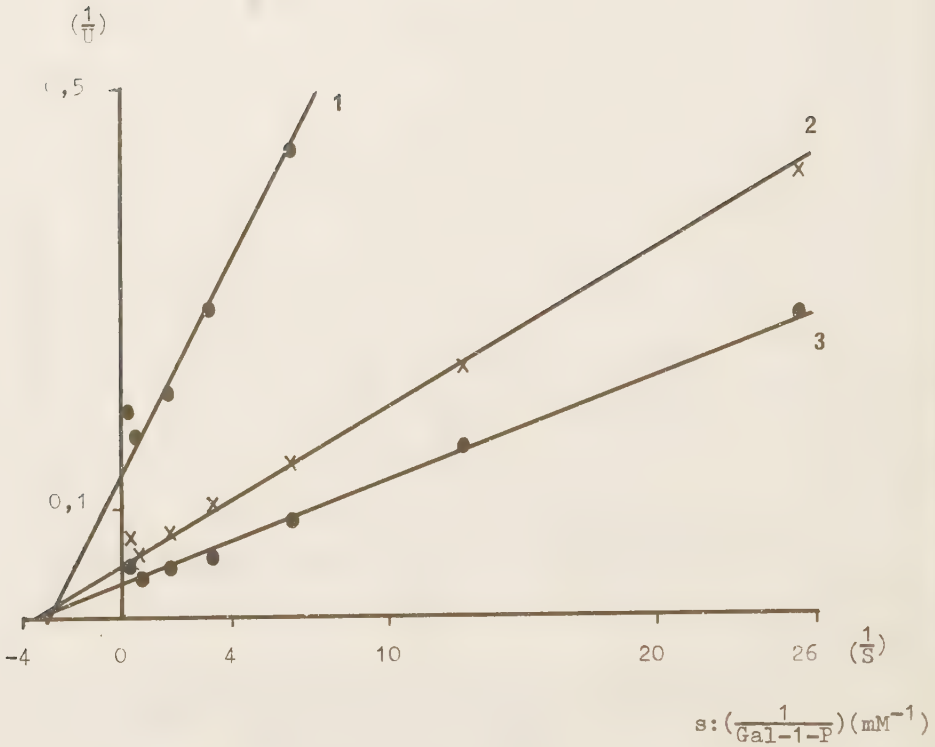


Abbildung 10a: Einfluß der Gal-1-P Konzentration auf die Transferaseaktivität bei 0,266 mM UDP-Glu
(Zuordnung von 1,2 und 3 Tabelle 4)

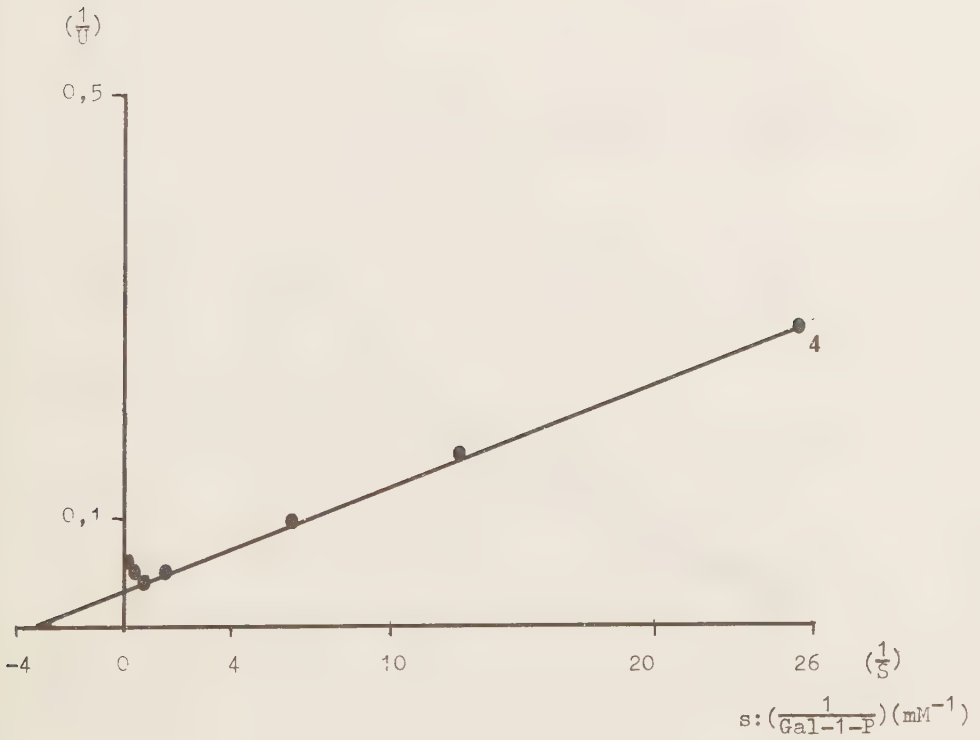


Abbildung 10b: Einfluß der Gal-1-P Konzentration auf die Transferaseaktivität bei 0,266 mM UDP-Glu (Fötus Nr.4: männl., 40.SSW, siehe auch Tab. 4)

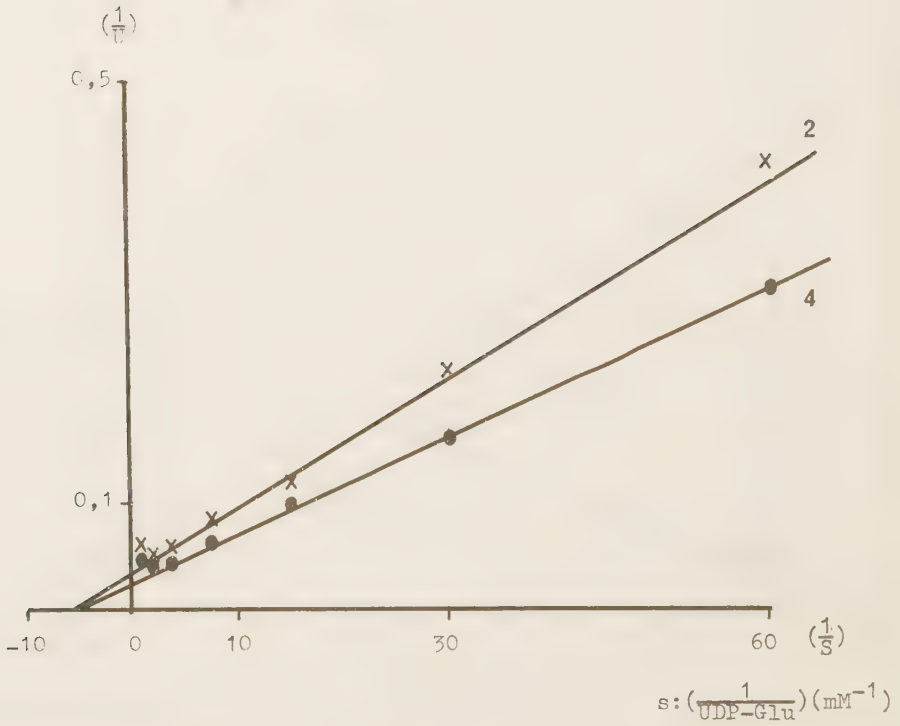


Abbildung 11: Einfluß der UDP-Glu Konzentration auf die Transferaseaktivität bei 0,733 mM Gal-1-P
(Zuordnung von 2 und 4 Tabelle 5)

L I T E R A T U R Y R E F E R E N C E S

- 1) Anderson, E.P., Kalckar, H.M. and Isselbacher, K.J.:
Defekt in uptake of galactose-1-phosphate into
liver nucleotides in congenital galactosemia.
Science, 125, 113 (1957)
- 2) Anderson, E.P., Kalckar, H.M., Karahashi, K. and
Isselbacher, K.J.:
A specific enzymatic assay for the diagnosis
of congenital galactosemia. 1. The consumption
test.
J. Lab. Clin. Med., 50, 469 (1957)
- 3) Bertoli, D. and Segal, S.:
Developmental aspects and some characteristics
of mammalian galactose-1-phosphate uridyl-
transferase.
J. Biol. Chem., 241, 4023 (1966)
- 4) Beutler, E. and Baluda, M.C.:
Biochemical properties of human red cell
galactose-1-phosphate uridyl transferase
(UDP glucose: α -D-galactose-1-phosphate uridyl-
transferase E.C.2.7.7.12.) from normal and
mutant subjects.
J. Lab. Clin. Med., 67, 427 (1966)
- 5) Beutler, E. and Baluda, M.C.:
Improved method for measuring galactose-1-
phosphate uridyltransferase activity of
erythrocyte.
Clin. Chim. Acta, 13, 369 (1966)

- 6) Donnel, G.N., Bergren, W.R., Bretthauer, R.H. and Hansen, R.G.:
The enzymatic expression of heterozygosity in
families of children with galactosemia.
Pediatrics, 25, 572 (1960)
- 7) Donnel, G.N., Bergren, W.R. and Ng, W.R.:
Galactosemia.
Biochem. Med., 1, 29 (1967)
- 8) Fensom, A.H., Benson, P.F. and Blunt, S.:
Prenatal diagnosis of galactosemia.
Brit. Med. J., 4, 346 (1974)
- 9) Ginsberg, V. and Neufeld, E.:
Abstract of the American Chemical Society Meeting.
New York, September 1957, p. 27C
- 10) Hammerson, G., Levy, H.L., Frigoletto, F. and Mandell, R.:
Comparison of galactose-1-phosphate uridyl
transferase in fetal and adult tissues.
Clin. Chim. Acta, 60, 281 (1975)
- 11) Holzel, A. and Komrover, G.M.:
A study of the genetics of galactosemia.
Arch. Dis. Child., 30, 155 (1955)
- 12) Hsia, D.Y.Y. and Walker, F.A.:
Variability in the clinical manifestation of
galactosemia.
J. of Pediatrics, 59, 872 (1961)
- 13) Inouye, T., Sadler, H.L. and Hsia, D.Y.Y.:
Galactose-1-phosphate uridyltransferase in red
and white blood cells.
Clin. Chim. Acta, 19, 169 (1968)
- 14) Isselbacher, K.J.:
Galactosemia. in: Metabolic Bases of inherited
Disease.
Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Fredrickson,
D.S., McGraw Hill Company, New York, second
edition, (1966) p.178

- 15) Kabacy, G., Hodgman, J.L., Donnel, G.W. and Spears, R.L.:
Galactose-1-phosphate uridyl transferase levels in the newborn.
Pediatrics, 38, 125 (1966)
- 16) Kalckar, H.M., Anderson, E.P. and Isselbacher, K.J.:
Galactosemia a congenital defect in nucleotide transferase.
Biochem. Biophys. Acta, 20, 262 (1956)
- 17) Kalckar, H.M., Braganca, B. and Hunch-Peterson, A.:
Uridyl transferase and the formation of uridine diphosphate galactose.
Nature, 172, 1038 (1953)
- 18) Kalckar, H.M. and Maxwell, E.S.:
Biosynthesis and the metabolic function of uridine diphosphoglucose in mammalian organisms and its relevance to certain inborn errors.
Physiol. Rev., 38, 77 (1958)
- 19) Kielhorn, A. und Gladte, E.:
Die Stoffwechselkinetik der Galaktose beim Kind.
Dtsch. med. Wschr., 97, 462 (1972)
- 20) Kirkmann, H.N. and Maxwell, E.S.:
Enzymatic estimation of erythrocytic galactose-1-phosphate.
J. Lab. Clin. Med., 56, 161 (1960)
- 21) Koo, C., Rogers, S. and Segal, S.:
Development aspects of galactose-1-phosphate uridyltransferase in rat intestine.
Biol. Neonate, 27, 153 (1975)
- 22) Krooth, R.S. and Weinberg, A.N.:
Studies on cell lines developed from tissues of patients with galactosemia.
J. Exp. Med., 113, 1155 (1966)

- 23) Deloir, L.F.:
The enzymatic transformation of the uridine diphosphate glucose in a galactose derivate.
Arch. Biochem. Biophys., 33, 186 (1951)
- 24) Lerman, S.:
Carbohydrate metabolism in the experimental galactose cataract.
Nature, 184, 1406 (1959)
- 25) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
- 26) Mellmann, W.J. and Tedesco, T.A.:
An improved assay of erythrocyte and leukocyte galactose-1-phosphate uridylyltransferase.
Stabilization of the enzyme by a thiol protective reagent.
J. Lab. Clin. Med., 66, 980 (1965)
- 27) Ng, W.G., Bergren, W.R. and Donnel, G.N.:
Assay of hemolysate gal-1-p uridyl transferase activity by radioactivity. in: Galactosemia.
Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, p.98 (1969)
- 28) Ng, W.G., Donnel, G.N., Bergren, W.R., Alfi, O. and Globus, M.S.:
Prenatal diagnosis of galactosemia.
Clin. Chim. Acta, 74, 227 (1977)
- 29) Cliver, I.T.:
Inhibitor studies on uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase.
Biochem. Biophys. Acta, 52, 75 (1961)

- 30) Robinson, A.:
The assay of galactokinase and galactose-1-phosphate uridylyltransferase.
J. Exp. Med., 118, 359 (1963)
- 31) Rogers, S., Holtzapple, P.G., Mellmann, W.J. and Segal, S.:
Characteristic of galactose-1-phosphate uridylyltransferase in intestinal mucosa of normal and galactosemic humans.
Metabolism, 19, 701 (1970)
- 32) Schaub, J. und Osang, M.:
Angeborene Enzymdefekte des Kohlenhydratstoffwechsels.
Münch. med. Wschr., 118, 609 (1976)
- 33) Schwarz, V., Goldberg, L., Kromrover, G.M. and Holzel, A.:
Some disturbances of erythrocyte metabolism in galactosemia.
Biochem. J., 62, 34 (1956)
- 34) Schwarz, V., Holzel, A. and Kromrover, G.M.:
Laboratory diagnosis of congenital galactosemia at birth.
Lancet, 1, 24 (1958)
- 35) Segal, S., Blair, A. and Roth, H.:
The metabolism of galactose by patients with congenital galactosemia.
Amer. J. Med., 38, 62 (1965)
- 36) Segal, S., Rogers, S. and Holtzapple, P.G.:
Liver galactose-1-phosphate uridylyltransferase: Activity in normal and galactosemic subjects:
J. Clin. Inves., 50, 500 (1972)
- 37) Shin-Bühring, Y., Osang, M., Ziegler, R. and Schaub, J.:
A method for galactose-1-phosphate uridylyltransferase assay and the separation of its isoenzymes by DEAE-cellulose column chromatography.
Clin. Chim. Acta, 70, 371 (1976)

- 38) Sidbury, J.E. and Garner, L.I. (Editor):
Molecular genetics and human disease.
Charles C. Thomas, Springfield, Illinois,
p.61 (1960)
- 39) Stümpfig, L.:
Unveröffentlichte Ergebnisse (1977)
- 40) Trucco, R.E., Caputto, R., Leloir, L.F. and Mittelman, N.:
Galaktokinase.
Arch. Biochem., 18, 186 (1948)
- 41) Walker, F.R., Hsia, D.Y.Y., Slatis, H.M. and Steinberg, A.G.:
Galactosemia: A study of twenty-seven kindreds
in North-America.
Ann. Hum. Genet., 25, 287 (1962)
- 42) Weinberg, A.N.:
Detection of congenital galactosemia and the
carrier state using galactose C-14 and blood
cells.
Metabolism, 10, 728 (1961)
- 43) Won, G.Ng.:
Galactose metabolism in red cell.
Exp. Eye. Res., 11, 402 (1971)
- 44) Won, G.Ng., Bergren, W.R., Donnel, G.N. and Hodgman, J.E.:
Galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity
in hemolysates of newborn infants.
Pediatrics, 39, 293 (1967)

Herrn Priv.Doz. Dr. Jürgen Schaub danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, für die stets hilfreiche und freundliche Unterstützung und den Rat zur Durchführung dieser Arbeit, sowie für das mir entgegengebrachte Wohlwollen.

Dank sage ich Frau Dr. Yoon Shin-Bühning für ihre freundschaftlichen Anregungen und Ratschläge bei der technischen Durchführung der Versuche und Messungen.

LEBENS LAUF

Am 30. April 1953 wurde ich als Sohn des Steuerbeamten Hubert Beier und seiner Ehefrau Anna, geb. Darchinger, in Wolfratshausen geboren. Nach Besuch der Volksschule in Wolfratshausen von 1959 - 1963 wechselte ich im September 1963 auf das neusprachliche Gymnasium Icking über, wo ich am 23. Juni 1972 meine Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1972/73 begann ich mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität in München. Im August 1974 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im August 1975 die 1. Ärztliche Prüfung und im August 1977 die 2. Ärztliche Prüfung. Seit 3. Oktober 1977 bin ich im Rahmen des Praktischen Jahres als Internatsstudent tätig.

